家蚕羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9 的鉴定与表达分析

林 超[1,3]，李 兵[1,2,3]，王 东[1,3]，赵国栋[1,3]，卫正国[1,2,3]，陈玉华[1,2,3]，沈卫德[1,2,3,*]
（1. 现代丝绸国家工程实验室，江苏苏州 215123；2. 苏州大学蚕桑研究所，江苏苏州 215123；
3. 苏州大学基础医学与生物科学学院，江苏苏州 215123）

摘要：羧酸酯酶是一个多功能超家族酶类，为研究羧酸酯酶基因在家蚕 *Bombyx mori* 组织中的功能，利用5′/3′RACE和RT-PCR方法克隆了一个家蚕羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9，其 GenBank 登录号为 EU523534。该基因含有一个1 680 bp的 ORF，编码559 个氨基酸。BmCarE-9 预测的分子量64.2 kD，等电点7.13，结构分析表明 BmCarE-9 存在一个类似的催化三联体，其中两个残基发生改变。利用实时荧光定量PCR 方法研究了该基因在家蚕5 龄第3 天幼虫不同组织以及在5 龄期各日龄幼虫丝腺组织中的表达水平。结果表明，该基因在丝腺中特异性高表达，且主要在中部和后部丝腺中表达。该基因在5 龄期随着丝腺的生长发育表达量逐渐增高，到末期表达水平逐渐降低。据此推测该基因可能与丝腺的生长发育或丝蛋白的合成相关。

关键词：家蚕；*BmCarE*-9；丝腺；实时荧光定量 PCR；组织表达
中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)05-0495-07

Identification and expression analysis of carboxylesterase gene *BmCarE*-9 in *Bombyx mori*

LIN Chao[1,3], LI Bing[1,2,3], WANG Dong[1,3], ZHAO Guo-Dong[1,3], WEI Zheng-Guo[1,2,3], CHEN Yu-Hua[1,2,3], SHEN Wei-De[1,2,3,*] (1. The State Engineering Laboratory of Modern Silk, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. Institute of Sericulture, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 3. School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: Carboxylesterase is a multifunctional superfamily. To determine the function of carboxylesterase in different tissues of *Bombyx mori*, we cloned a carboxylesterase gene named *BmCarE*-9 (GenBank accession no. EU523534) from *B. mori* by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. *BmCarE*-9 contains a 1 680 bp open reading frame (ORF), which encodes 559 amino acids. This cDNA-deduced protein BmCarE-9 has a predicted molecular weight (MW) of 64.2 kD, and isoelectric point (pI) of 7.13. Structure analysis showed that BmCarE-9 has a similar catalytic triad in which two residues have changed. We investigated the developmental expression patterns of *BmCarE*-9 in different tissues of the Day-3 5th instar larvae and in silk glands of different day-old 5th instar larvae by real-time quantitative PCR. The results showed that *BmCarE*-9 was expressed specifically in silk glands at high levels, and mainly expressed in the median and posterior silk glands. Furthermore, the expression of *BmCarE*-9 increased as silk glands developed, and decreased at the end of 5th instar stage. It is so inferred that *BmCarE*-9 might be involved in the development of silk glands or the synthesis of silk proteins.

Key words: *Bombyx mori*; *BmCarE*-9; silk gland; real-time quantitative PCR; tissue expression

羧酸酯酶(EC3.1.1.1)基因组成是一个多功能超家族，它广泛存在于昆虫、植物、动物和微生物中(Satoh and Hosokawa, 1998; Ranson *et al*., 2002; Bornscheuer, 2002; Marshall *et al*., 2003)。羧酸酯酶是α/β 水解酶折叠蛋白，属丝氨酸水解酶家族，在其结构中含有一个催化三联体活性中心(Ser-His-Glu)(滕霞和孙曼霁, 2003)，它能有效催化含羧基酯键、酰胺键和硫酯键的内源性与外源性多种化合

基金项目：国家自然科学基金项目(31072086)；苏州市科技项目(SYN201009)
作者简介：林超，女，1986 年生，江苏南京人，硕士研究生，主要从事昆虫分子生物学研究，E-mail：linchao.zone@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shenwd@suda.edu.cn
收稿日期 Received：2010-10-08；接受日期 Accepted：2011-01-23

物的水解(Cygler *et al.*, 1993)。

目前，在昆虫中关于羧酸酯酶的报道主要集中于其介导杀虫剂抗药性的研究(Hemingway and Karunaratne, 1998; Li *et al.*, 2007)。昆虫能通过羧酸酯酶基因扩增、表达上调和编码序列突变来增加对有机磷、氨基甲酸酯和拟除虫菊酯类杀虫剂的抗性(Li *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2009)。Newcomb 等(1997)克隆了铜绿蝇 *Lucilia cuprina* 有机磷药剂抗性、敏感品系羧酸酯酶基因，发现抗性品系在 Gly137 氨基酸位点上发生的突变与抗性有关。Pan 等(2009)发现羧酸酯酶基因扩增可能在棉蚜 *Aphis gossypii* 对马拉硫磷的抗性中起着重要作用。近来也有一些研究证实，羧酸酯酶在植物种间物质的耐受性上起着重要作用，它与植物次级代谢物的解毒有关。Cai 等(2009)发现麦长管蚜 *Sitobion avenae* 中的羧酸酯酶的活性与食物中所含的芦竹碱的含量正相关。此外，也有部分关于羧酸酯酶参与信息素和激素降解方面作用的研究。如其中一个 55 kD 的雄性触角特异酯酶(SE)首次在多音天蚕 *Antheraea polyphemus* 上由 Vogt 和 Riddiford (1981)鉴定到，随后 Ishida 和 Leal(2005)从分子水平上鉴定了此基因，并证明该酯酶能以比预期更快的速度降解信息素。Merlin 等(2007)也在甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 中鉴定了一个仅在雌性和雄性的触角中表达的酯酶，表明该酯酶可能参与了信息素的降解。保幼激素酯酶，作为羧酸酯酶大家族中的一类，它能特异性降解家蚕体内的保幼激素，在许多生理过程的调节中起着重要作用(Riddiford, 1994; Wyatt and Davey, 1996; Jallon and Wicker-Thomas, 2003)。羧酸酯酶在神经形成和发育调节中的作用也见报道。如 Biswas 等(2008, 2010)近来对蜜蜂的神经连接蛋白(羧酸酯酶家族中的一种)的研究表明其与神经发育调节相关。

羧酸酯酶家族基因分布非常广泛，从原核生物到脊椎动物都有存在，对该基因作用的阐明将具有非常广泛的生物学意义。家蚕 *Bombyx mori* 作为继黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 和冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 等昆虫之后又一个全基因组测序昆虫(Xia *et al.*, 2004, 2008)，是国际鳞翅目基因组协会确定的鳞翅目昆虫的模式昆虫，大量的基因组信息和 EST 数据库为利用生物信息学方法研究新基因及其功能提供了非常大的便利。家蚕是重要的经济昆虫，其最重要的经济价值就是分泌蚕丝。丝腺是家蚕幼虫末期蚕体内最大的器官，是合成、分泌丝物质的外分泌腺。本研究通过生物信息学分析和 RACE 以及 RT-PCR 方法，从家蚕中克隆了一个新的在丝腺中高表达的羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9，序列分析表明它与之前所克隆到的几个羧酸酯酶基因的同源性均不高，如与 *BmCarE*-3 和 *BmCarE*-6 的相似性分别为 47.6% 和 47.7%。我们对该基因在家蚕 5 龄幼虫不同组织中以及不同部位丝腺中的表达水平进行了定量研究。本文为研究羧酸酯酶基因可能在丝腺组织中参与的新的生理功能提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 家蚕品系和组织取材：以本研究室保存的家蚕大造品系(Dazao)为实验材料，用桑叶于温度 26 ± 1℃，相对湿度 60%~75% 的条件下进行饲养。在家蚕幼虫期 5 龄第 3 天分别收集其头部、中肠、脂肪体、马氏管、丝腺、精巢、卵巢和血液，在 5 龄期各天收集其丝腺组织，取 10 头蚕为一个样本，设 3 个重复。然后立即将组织用液氮冷冻，置于 −80℃保存，用于提取 RNA。

1.1.2 试剂：*Ex Taq* 酶、*LA Taq* 酶、pMD19-T 载体、总 RNA 抽提试剂盒 RNAiso Plus，RTase M-MLV ($RNaseH^-$)、RNase Inhibitor、SYBR *Premix Ex Taq* 和 5′-Full Race Kit 等均为 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司产品；引物、异丙醇、DEPC 水和凝胶回收试剂盒均为上海生工生物工程公司产品；质粒抽提试剂盒为上海申能博彩公司产品；三氯甲烷由南京化学试剂有限公司提供。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

利用 RNAiso Plus 试剂，按照产品说明书提供的方法提取家蚕组织的总 RNA。第一链 cDNA 合成反应 50 μL 体系包括：总 RNA 1 μg，50 μmol/L Oligo $(dT)_{16}$ 引物 1 μL，5 × M-MLV buffer 10 μL，10 mmol/L dNTPs 各 2.5 μL，40 U/μL RNase Inhibitor 0.5 μL，200 U/μL RTase M-MLV 1 μL；于 42℃反应 1 h，然后 70℃15 min 使 M-MLV 酶失活。

1.3 5′/3′RACE 和 RT-PCR

通过昆虫羧酸酯酶基因的保守序列与家蚕 EST 数据库进行比对搜索相似序列，我们鉴定并拼接了一条推定家蚕羧酸酯酶基因的部分序列，随后根据这一拼接序列设计了多对引物，5′RACE 和 3′RACE 引物见表 1。5′RACE 按照 5′-Full Race Kit 说明进

行，3′RACE 的 cDNA 第一链的合成，3′端锚定 Oligo dT 引物为 5′-ACGCTACACGACTCACTAATGGGC(T)$_{13}$-3′。根据 5′RACE 和 3′RACE 测序结果设计编码区 5′端正义引物和 3′端反义引物见表 1。RT-PCR 反应条件为：94℃预变性 2 min；然后 94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 2 min，共 30 个循环；最后 72℃延伸 10 min。RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳，凝胶纯化试剂盒纯化后，克隆进 pMD19-T 载体中，用质粒抽提试剂盒抽提重组质粒，然后送交上海生工生物工程公司进行测序。

1.4　羧酸酯酶基因的表达分析

利用实时荧光定量 Real-time PCR（qRT-PCR）研究羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9 分别在幼虫期 5 龄第 3 天多个组织及 5 龄各日龄丝腺组织中的表达分布。根据克隆的家蚕羧酸酯酶基因序列与家蚕基因组序列进行比对，采用 Primer 5.0 软件设计跨内含子的定量引物，采用家蚕管家基因 *Actin*3 作内参。引物如表 1 所示。qRT-PCR 反应采用荧光染料 SYBR Green Ⅰ在 ABI Prism 7300 上进行。PCR 反应条件为：SYBR *Premix Ex Taq*（2×）10 μL，上游引物（10 μmol/L）0.4 μL，下游引物（10 μmol/L）0.4 μL，ROX Reference Dye（50×）0.4 μL，模板 2.0 μL，ddH$_2$O 6.8 μL，总体系 20 μL。PCR 程序：两步法 PCR 扩增，50℃ 2 min；95℃预变性 1 min；95℃ 15 s，60℃ 31 s，45 个循环；加上溶解曲线。每个样品重复测定 3 次。

1.5　数据统计与分析

将反转录得到的 5 龄第 3 天家蚕丝腺的 cDNA 用去离子水稀释成不同浓度梯度，利用 qRT-PCR 方法测定不同浓度的丝腺中 *Actin*3 和 *BmCarE*-9 的 Ct 值，制作标准曲线，所有定量的结果数据用仪器自带的 Sequence detection software version 1.3.1 软件处理，并参照 Schefe 等（2006）的方法进行效率校正，图表采用 SPSS 16.0 软件制作。

1.6　在线序列比对和分析程序

蛋白质序列分析采用 Expasy 在线 ScanProsite 程序；蛋白质分子量和等电点分析采用 http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html 在线工具；序列比对使用 Clustalw 程序；基因组序列和 EST 数据搜索使用 NCBI 上的 Blast 在线程序；信号肽序列预测采用 http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP 在线程序进行。

表 1　基因克隆及 qRT-PCR 引物

Table 1　Primer sequences used in gene cloning and qRT-PCR

基因 Gene	作用 Function	引物 Primers（5′－3′）
BmCarE-9	5′ RACE	Outer：CCTTTTCGTTGGATGATTGTGATAC
		Inner：TTGATCTACTTGCGGGCACATTCT
	3′ RACE	Outer：TTTATTGAAAGCGGAGCGAACAT
		Inner：ACACATACCCAAACGCAACGAGAG
	RT-PCR	Sense：CGAGCGACGGTAACTACAATA
		Antisense：AATGTCGTACAGTGTTGGAAGATA
	qRT-PCR	Sense：GAGCGACGGTAACTACAATA
		Antisense：CTACTTGCGGGCACATT
*Actin*3	qRT-PCR	Sense：TCTACAATGAGCTGCGTGTC
		Antisense：GAGTGCGTATCCCTCGTAG

2　结果与分析

2.1　家蚕羧酸酯酶基因的克隆和序列分析

利用 5′ RACE 方法从家蚕丝腺中克隆了该基因 5′ 端序列，得到一条 364 bp 的片段，然后利用 3′ RACE 方法克隆该基因的 3′ 端序列，得到一条 613 bp 的片段，将 5′ RACE 产物和 3′ RACE 产物分别与 pMD19-T 载体连接，挑选阳性克隆，抽提质粒，送去测序，重组质粒经 *Hin*d Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳检测，出现 2 条 DNA 条带，与预期大小基本一致（图 1：A，B）。然后根据测序结果设计 RT-PCR 引物克隆这一基因的编码区序列，得到一条 1 734 bp 的片段，切胶回收该片段，

将其与 pMD19-T 载体连接。挑选阳性克隆，抽提质粒，经 *Hin*d Ⅲ和 *Bam*H Ⅰ双酶切，1% 琼脂糖凝胶电泳检测，出现 2 条 DNA 条带，与预期大小基本一致(图 1：C)。最后将这几段序列拼接得到该基因的全长序列，大小为 1 965 bp。根据 GenBank 上已提交家蚕羧酸酯酶基因序列的先后顺序，将该基因命名为 *BmCarE*-9，GenBank 登录号为 EU523534。

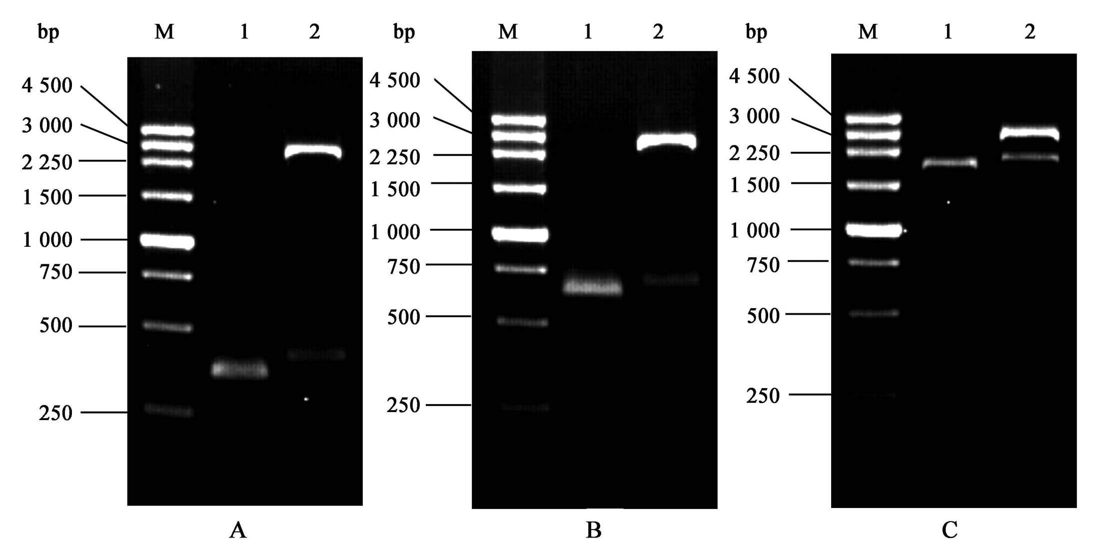


图 1 家蚕羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9 克隆

Fig. 1 Cloning of carboxylesterase gene *BmCarE*-9 from *Bombyx mori*

M：250 bp 分子量标准 250 bp DNA Ladder；A：5′端序列扩增与鉴定 Rapid amplification of 5′ cDNA ends. 1：5′ RACE 产物 5′ RACE product；2：连接有 5′ RACE 扩增片段的 pMD19-T 载体双酶切结果 Restriction digest of recombinant pMD19-T vector containing 5′ RACE fragment. B：3′端序列扩增与鉴定 Rapid amplification of 3′ cDNA ends. 1：3′ RACE 产物 3′ RACE product；2：连接有 3′ RACE 扩增片段的 pMD19-T 载体双酶切结果 Restriction digest of recombinant pMD19-T vector containing 3′ RACE fragment. C：编码区序列克隆与鉴定 Cloning of ORF sequence. 1：编码区克隆 Cloning of ORF region；2：连接有编码区序列的 pMD19-T 载体双酶切结果 Restriction digest of recombinant pMD19-T vector containing coding region sequences.

序列分析表明，*BmCarE*-9 含有一个 1 680 bp 的开放阅读框(ORF)，有 26 bp 的 5′ UTR，247 bp 的 3′ UTR，编码 559 个氨基酸残基。该基因推定的蛋白质分子量为 64.2 kD，等电点为 7.13，含有 9 个潜在的 N-糖基化位点，分析表明 *BmCarE*-9 存在一个类似的三联体催化活性中心，但其中 Ser219 由 Gly219 取代，His458 由 Arg458 取代，只有 Glu342 这一位置是保守的。利用 SignalP 3.0 信号肽预测程序(http：//www. cbs. dtu. dk/services/SignalP/)分析表明 *BmCarE*-9 在 N 端含有一个推定的信号肽序列。

将 *BmCarE*-9 的序列与家蚕基因组序列进行比较，鉴定了该基因的内含子/外显子结构(图 2)。分析表明内含子和外显子结合位点都符合 GT-AG 规则，该基因具有 2 个内含子和 3 个外显子。将该基因在西南大学的 Silkmap 程序上进行比对，发现其位于第 15 号染色体上。

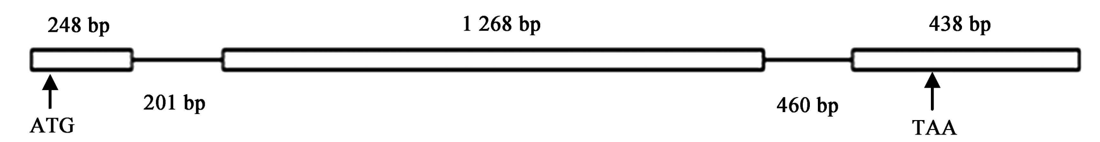


图 2 家蚕羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9 的基因结构

Fig. 2 Structure of carboxylesterase gene *BmCarE*-9 from *Bombyx mori*

黑色线条下面的数字和灰色方框上面的数字分别表示内含子和外显子的大小。The numbers below the black line and above gray box represent the length of corresponding introns and exons, respectively.

将鉴定的家蚕羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9 推定的氨基酸序列在 NCBI 的 BlastP 程序上进行同源性比对分析。结果表明 BmCarE-9 与棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的酯酶 CCE006a 的相似性达到 42.2%；与家蚕 BmCarE-11 和 α-酯酶 49 同源性也较高，相似性分别达到 41.0% 和 41.1%；与灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的触角酯酶 CXE12 的相似性为 33.2%。

2.2　*BmCare*-9 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织的转录水平

利用 qRT-PCR 研究 *BmCarE*-9 在 5 龄第 3 天的家蚕头部、中肠、脂肪体、马氏管、丝腺、精巢、卵巢和血淋巴 8 个组织中的转录水平(图 3)，利用家蚕 *Actin*3 作为内参基因，进行归一化处理。结果显示，*BmCarE*-9 在丝腺中的转录水平最高，而在其他 7 个组织中表达量很低或几乎不表达。

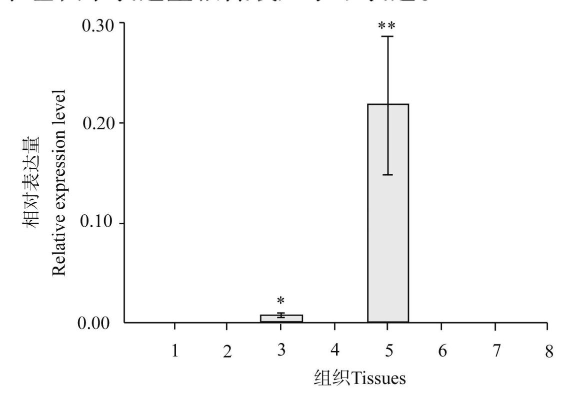


图 3　*BmCarE*-9 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫各组织中的表达

Fig. 3　Expression of *BmCarE*-9 in various tissues of Day-3 5th instar larvae of *Bombyx mori*

1：头部 Head；2：中肠 Midgut；3：脂肪体 Fat body；4：马氏管 Malpighian tubles；5：丝腺 Silk glands；6：精巢 Testis；7：卵巢 Ovary；8：血淋巴 Hemolymph. 图中数值为平均值 ± 标准差；将相对表达量最低的样品与其他所有样品进行了差异显著性比较(*t* 检验)；* $0.01 \leq P \leq 0.05$，** $P < 0.01$；下同。Data in the figure are mean ± *SD*; the significances of differences between the sample with the smallest relative expression level and the other samples were compared by *t* test. * $0.01 \leq P \leq 0.05$; ** $P < 0.01$. The same below.

2.3　*BmCarE*-9 分别在家蚕 5 龄第 3 天前中后部丝腺中的转录水平

家蚕丝腺分为前部、中部和后部丝腺，分别具有不同的功能，因此为了进一步研究该基因主要是在丝腺的哪一部位表达，我们利用 qRT-PCR 研究 *BmCarE*-9 在 5 龄第 3 天的家蚕前部、中部和后部丝腺中的表达情况(图 4)，家蚕 *Actin*3 作为内参基因，进行归一化处理。结果表明，*BmCarE*-9 基因在 5 龄第 3 天在后部丝腺相对表达量最高，中部丝腺其次，前部丝腺最低。

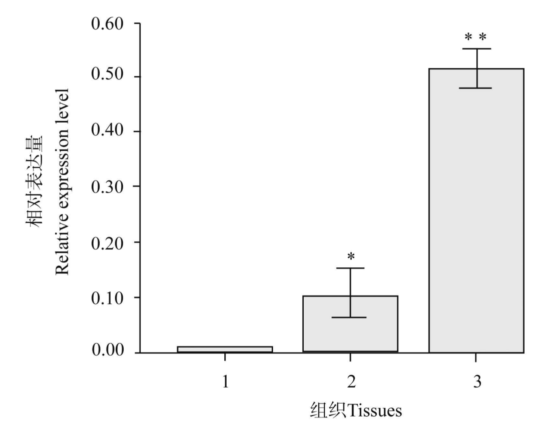


图 4　*BmCarE*-9 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫前、中和后部丝腺中的表达

Fig. 4　Expression of *BmCarE*-9 in anterior, median and posterior silk glands of Day-3 5th instar larvae of *Bombyx mori*

1：前部丝腺 Anterior silk gland；2：中部丝腺 Median silk gland；3：后部丝腺 Posterior silk gland.

2.4　*BmCarE*-9 在家蚕 5 龄各日龄幼虫丝腺中的转录水平

通过图 3，我们发现 *BmCarE*-9 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫丝腺中的表达量非常高，而在头部、中肠、脂肪体、马氏管、精巢、卵巢、血淋巴等 7 个组织中几乎不表达。为进一步研究该基因在家蚕整个 5 龄期丝腺中的表达模式，我们利用 qRT-PCR 方法对该基因在 5 龄期各日龄幼虫的整体丝腺中的相对表达水平进行了测定(图 5)。结果显示，*BmCarE*-9 在家蚕 5 龄前期 1 ~3 d 的表达水平逐渐上升，在 5 龄中期 4 ~7 d 表达量达到最高并维持较高水平，到了 5 龄后期 8 ~9 d 表达水平又逐渐下降，到第 9 天(即家蚕开始吐丝第 1 天)，表达量下降到最低水平。

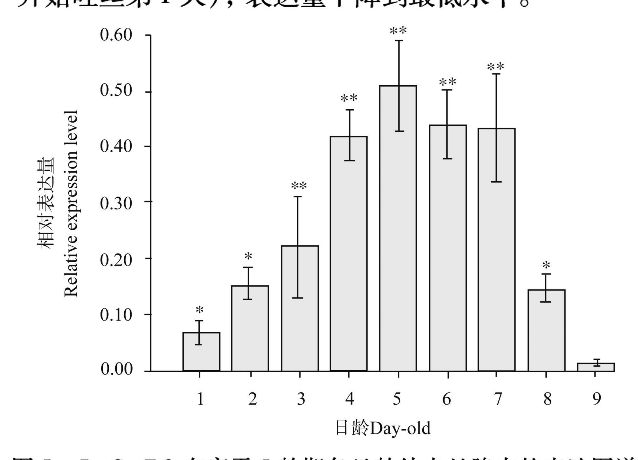


图 5　*BmCarE*-9 在家蚕 5 龄期各日龄幼虫丝腺中的表达图谱

Fig. 5　Expression profiles of *BmCarE*-9 in silk glands of different day-old 5th instar larvae of *Bombyx mori*

3 讨论

本研究将昆虫羧酸酯酶基因的保守序列与家蚕 EST 数据库进行比对搜索相似序列，利用 RACE 和 RT-PCR 方法克隆了一个家蚕羧酸酯酶基因的全长 cDNA 序列，推定的氨基酸序列含有一个类似丝氨酸蛋白酶家族的催化三联体位点，其中只有 Glu342 是保守位点。序列分析表明，*BmCarE*-9 含有 9 个潜在的 N-糖基化位点，表明此蛋白可能存在翻译后糖基化修饰。Kroetz 等(1993)通过用杆状病毒系统表达两个高度相似的人类肝脏羧酸酯酶基因并进行了酶活性测定，表明这种修饰可能对羧酸酯酶的最大催化活性具有一定的影响。此外，该蛋白还含有一个推定的 23 个氨基酸残基的信号肽序列，表明此蛋白可能是分泌型的，主要分泌到细胞外去执行相应的功能(Field *et al*., 1993)。

本研究发现 *BmCarE*-9 在丝腺组织中特异高表达，而在 Tsubota 等(2010)鉴定的 5 个家蚕羧酸酯酶基因中，有一个基因 *Bmcce*-1 在丝腺中特异性高表达，Yu 等(2009)也发现了几个在家蚕丝腺中特异表达的羧酸酯酶基因。序列比对分析表明 *BmCarE*-9 与之前所报道的在丝腺中高表达的基因的同源性都不高，而如此多的羧酸酯酶基因在家蚕丝腺中特异性高表达，这表明羧酸酯酶基因可能在丝腺中起着非常重要的作用。5 龄初期家蚕丝腺较小，*BmCarE*-9 的表达量也较低；随着 5 龄期天数增加，丝腺迅速增大，*BmCarE*-9 的表达量也迅速升高，并在 5 龄中期达到最高并维持在较高水平；而在 5 龄末期，丝腺几乎停止发育，*BmCarE*-9 的表达量也逐渐降低，这表明该羧酸酯酶基因可能与丝腺的生长发育相关。此外，*BmCarE*-9 在中部和后部丝腺表达量较高，由于家蚕的中部和后部丝腺专门负责丝蛋白的合成，而羧酸酯酶具有水解酶和乙酯合成酶的活性(Holmes *et al*., 2008)，所以我们推测 *BmCarE*-9 可能参与了丝蛋白的合成。目前，羧酸酯酶按功能不同主要分为 3 类：外源物解毒类、激素和信息素降解类和神经发育类(Oakeshott *et al*., 2005；Claudianos *et al*., 2006)。但是由于昆虫具有大量的羧酸酯酶，其中仍然有许多未知的功能有待进一步研究(Ranson *et al*., 2002；Strode *et al*., 2008；Oakeshott *et al*., 2010；Ramsey *et al*., 2010)。本文对所克隆的羧酸酯酶基因 *BmCarE*-9 进行了定量研究，发现该基因在家蚕丝腺中特异性高表达，推测该基因可能与丝腺的发育相关，并参与丝蛋白的合成。丝腺是经济型昆虫家蚕的重要器官，深入研究在家蚕丝腺中高表达的羧酸酯酶基因，可以为研究羧酸酯酶基因的生理功能提供借鉴，并为进一步研究和利用家蚕这一经济昆虫提供帮助。

参 考 文 献 (References)

Biswas S, Reinhard J, Oakeshott J, Russell R, Srinivasan MV, Claudianos C, 2010. Sensory regulation of *neuroligins* and *neurexin I* in the honeybee brain. *PLoS ONE*, 5(2): e9133.

Biswas S, Russell RJ, Jackson CJ, Vidovic M, Ganeshina O, Oakeshott JG, Claudianos C, 2008. Bridging the synaptic gap: *neuroligins* and *neurexin I* in *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 3(10): e3542.

Bornscheuer UT, 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev*., 26 (1): 73 – 81.

Cai QN, Han Y, Cao YZ, Hu Y, Zhao X, Bi JL, 2009. Detoxification of gramine by the cereal aphid *Sitobion avenae*. *J. Chem. Ecol*., 35: 320 – 325.

Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol*., 15: 615 – 636.

Cygler M, Schrag JD, Sussman JL, Harel M, Silman I, Gentry MK, Doctor BP, 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Science*, 2(3): 366 – 382.

Field LM, Williamson MS, Moores GD, Devonshire AL, 1993. Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J*., 294 (2): 569 – 574.

Hemingway J, Karunaratne SH, 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med. Vet. Entomol*., 12: 1 – 12.

Holmes RS, Chan J, Cox LA, Murphy WJ, VandeBerg JL, 2008. Opossum carboxylesterases: sequences, phylogeny and evidence for *CES* gene duplication events predating the marsupial-eutherian common ancestor. *BMC Evol. Biol*., 8: 54.

Ishida Y, Leal WS, 2005. Rapid inactivation of a moth pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 14075 – 14079.

Jallon JM, Wicker-Thomas C, 2003. Genetic studies on pheromone production in *Drosophila*. In: Blomquist GJ, Vogt RG eds. Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology. Part 1. Biochemistry and Molecular Biology of Pheromone Production. Academic Press, New York, USA. 253 – 281.

Kroetz DL, McBride OW, Gonzalez FJ, 1993. Glycosylation-dependent activity of baculovirus-expressed human liver carboxylesterases: cDNA cloning and characterization of two highly similar enzyme forms. *Biochemistry*, 32(43): 11606 – 11617.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu.*

Rev. Entomol., 52: 231 – 253.

Marshall SD, Putterill JJ, Plummer KM, Newcomb RD, 2003. The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Evol.*, 57: 487 – 500.

Merlin C, Rosell G, Carot-Sans G, François MC, Bozzolan F, Pelletier J, Jacquin-Joly E, Guerrero A, Maïbèche-Coisne M, 2007. Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation. *Insect Mol. Biol.*, 16(1): 73 – 81.

Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, Russell RJ, Oakeshott JG, 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94 (14): 7464 – 7468.

Oakeshott JG, Claudianos C, Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, 2005. Biochemical genetics and genomics of insect esterases. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. Comprehensive Molecular Insect Science – Pharmacology. Elsevier BV, Oxford, UK. 309 – 361.

Oakeshott JG, Johnson RM, Berenbaum MR, Ranson H, Cristino AS, Claudianos C, 2010. Metabolic enzymes associated with xenobiotic and chemosensory responses in *Nasonia vitripennis*. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 1): 147 – 163.

Pan Y, Guo H, Gao X, 2009. Carboxylesterase activity, cDNA sequence, and gene expression in malathion susceptible and resistant strains of the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Comp. Biochem. Physiol B*, 152(3): 266 – 270.

Ramsey JS, Rider DS, Walsh TK, De Vos M, Gordon KH, Ponnala L, Macmil SL, Roe BA, Jander G, 2010. Comparative analysis of detoxification enzymes in *Acyrthosiphon pisum* and *Myzus persicae*. *Insect Mol. Biol.*, 19(Suppl. 2): 155 – 164.

Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R, 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*, 298: 179 – 181.

Riddiford LM, 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone Ⅰ. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in Insect Physiology*, 24: 213 – 274.

Satoh T, Hosokawa M, 1998. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38: 257 – 288.

Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H, 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C_T difference" formula. *J. Mol. Med.*, 84(11): 901 – 910.

Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne SHPP, Hemingway J, Black WCIV, Ranson H, 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 113 – 123.

Teng X, Sun MJ, 2003. Advances on carboxylesterase research. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 15(1): 31 – 35. [滕霞, 孙曼霁, 2003. 羧酸酯酶研究进展. 生命科学, 15(1): 31 – 35]

Tsubota T, Shimomura M, Ogura T, Seino A, Nakakura T, Mita K, Shinoda T, Shiotsuki T, 2010. Molecular characterization and functional analysis of novel carboxyl/cholinesterases with GQSAG motif in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40 (2): 100 – 112.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Wyatt GR, Davey KG, 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. Ⅱ. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Advances in Insect Physiology*, 26: 1 – 155.

Xia Q, Wang J, Zhou Z *et al.*, 2008. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1036 – 1045.

Xia Q, Zhou Z, Lu C *et al.*, 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703): 1937 – 1940.

Yan S, Cui F, Qiao C, 2009. Structure, function and applications of carboxylesterases from insects for insecticide resistance. *Protein Pept. Lett.*, 16(10): 1181 – 1188.

Yu QY, Lu C, Li WL, Li WX, Xiang ZH, Zhang Z, 2009. Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 553.

（责任编辑：赵利辉）